

雏番鸭细小病毒 *vp3* 基因的原核表达及增殖病毒的检测

黄瑜^{1*}, 朱于敏^{2*}, 董世娟², 于瑞嵩², 张源淑¹, 李震²

1 南京农业大学 农业部动物生理生化重点开放实验室, 江苏 南京 210095

2 上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106

黄瑜, 朱于敏, 董世娟, 等. 雏番鸭细小病毒 *vp3* 蛋白的原核表达及增殖病毒的检测. 生物工程学报, 2015, 31(1): 65-74.

Huang Y, Zhu YM, Dong SJ, et al. Prokaryotic expression of *vp3* gene of Muscovy duck parvovirus, and its antiserum preparation for detection of virus multiplication. Chin J Biotech, 2015, 31(1): 65-74.

摘要: 近年来, 番鸭细小病毒出现新的流行趋势, 估计与病毒基因变异有关, 因此针对新流行毒株研发新的检测方法很有必要。本研究根据番鸭细小病毒 (MDPV) 2012 年分离株 SAAS-SHNH 的全基因序列, 设计了一对特异性引物, 利用 PCR 技术扩增全长 *vp3* 基因, 经鉴定正确后, 进行同源性比对分析, 同时将其克隆到 PET28a 载体, 构建成 PET28a-VP3 原核表达载体, 经转化及 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 分析, 表达出与预期大小相符的 63.1 kDa 的蛋白, 该蛋白可与临床采集的免疫过 MDPV 的番鸭血清结合, 说明该蛋白可用于 MDPV 的血清学检测。将纯化后蛋白免疫新西兰大白兔, 制备兔源 MDPV-VP3 蛋白的多克隆抗体, 制备的兔源血清能够与 MDPV 疫苗弱毒株及 J3D6 株 VP3 蛋白发生特异结合; MDPV 感染原代鸭胚成纤维细胞 (DEF) 后, 利用兔源血清作为一抗进行免疫荧光分析 (IFA) 分析, 在 DEF 细胞核和细胞质内均能检测到 VP3 蛋白, 表明利用 VP3 蛋白制备的抗血清可以用于 MDPV 免疫荧光分析细胞增殖病毒的检测。这为今后 MDPV 的快速检测提供了技术基础。

关键词: MDPV, *vp3* 基因, 原核表达, 纯化, 免疫荧光分析

Received: March 14, 2014; **Accepted:** May 26, 2014

Supported by: Shanghai Technological Innovation Action Plan (No. 12231204502).

Corresponding author: Yuanshu Zhang. Tel: +86-25-84396763; E-mail: zhangyuanshu@njau.edu.cn
Zhen Li. Tel: +86-21-62200389; E-mail: zhenli60@163.com

* These authors contributed equally to this study.

上海科技创新行动计划 (No. 12231204502) 资助。

网络出版时间: 2014-06-16

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140150.html>

Prokaryotic expression of *vp3* gene of Muscovy duck parvovirus, and its antiserum preparation for detection of virus multiplication

Yu Huang^{1*}, Yumin Zhu^{2*}, Shijuan Dong², Ruisong Yu², Yuanshu Zhang¹, and Zhen Li²

1 Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

2 Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

Abstract: New epidemic broke out in recent year which was suspected to be caused by variant Muscovy duck parvovirus (MDPV). For this reason, new MDPV detection methods are needed for the new virus strains. In this study, a pair of primers were designed according to the full-length genome of MDPV strain SAAS-SHNNH, which were identified in 2012, and were used to amplify the *vp3* gene of MDPV by polymerase chain reaction. After being sequenced, the *vp3* gene was subcloned into the prokaryotic expression vector PET28a. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 and induced with IPTG. SDS-PAGE and Western blotting analysis showed the MDPV *vp3* gene was successfully expressed. After being purified by Ni²⁺ affinity chromatography system, the recombinant protein was used as antigen to immunize rabbits to obtain antiserum. Western blotting analysis showed that the acquired antiserum could react specifically with VP3 protein of J3D6 strain and MDPV vaccine strain. The antiserum could also be used for detection of cultured MDPV from primary duck embryo fibroblasts by immune fluorescence assay (IFA). It could be concluded that the VP3 protein and its antibody prepared in the research could be used for detection of VP3 antiserum and antigen respectively.

Keywords: MDPV, *vp3* gene, prokaryotic expression, purification, immune fluorescence assay

维番鸭细小病毒病 (Muscovy duck parvovirus disease, MDPD), 是由维番鸭细小病毒 (Muscovy duck parvovirus, MDPV) 引起的一种急性、败血性传染病, 该病主要发生于 3 周龄以内的番鸭, 又称三周病^[1]。MDPV 的主要临床症状是喘气、厌食、腹泻、脱水及迅速消瘦^[2]。该病传播快, 发病率、死亡率都很高, 是造成番鸭养殖中经济损失的主要传染病之一^[3-4]。1991 年由我国的林世棠最先报道, 该病也在福建省莆田、福州等地的维番鸭群中造成大量死亡, 经济损失极为严重^[5-8]。2012 年, 上海及周边暴发了严重的番鸭细小病毒疫病。这次疫病发病急, 病鸭死亡率高达 50%, 而发病

前, 这群番鸭已免疫过三周病、小鹅瘟二联弱毒活疫苗。因为持续使用疫苗会造成长期免疫压力, 导致病原基因变异^[9-11]。为此, 我们进行了 MDPV 的病原分离并对其做了全基因序列检测, 新分离病毒株命名为 SAAS-SHNNH (GenBank Accession No. KC_171936.1)。

MDPV 为细小病毒科细小病毒亚科依赖病毒 (Dependovirus) 属成员, 为单股、线性 DNA 病毒^[12]。MDPV 基因组两端为回文序列折叠形成的发夹结构, 中间的编码含有两个开放阅读框 (Open reading frame, ORF)^[13], 左侧编码非结构蛋白 NS1 和 NS2, 右侧 ORF 编码核衣壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3^[14]。*vp2* 和 *vp3* 基因编码的

氨基酸位于 *vp1* 内部, 这 3 种 *vp* 基因的起始密码子的位置不同, 但三者共用同一个终止密码子。VP2 和 VP3 是主要的结构蛋白, 而 VP3 蛋白在 3 种结构蛋白中含量最高, 能够在感染 MDPV 的水禽中诱导产生中和抗体^[15-16]。因此, VP3 蛋白常被用来检测 MDPV 的特异性抗体。

针对 2012 年上海暴发的番鸭细小病毒疫病, 本研究利用原核系统表达了 SAAS-SHNH 株的 VP3 蛋白, 纯化后免疫新西兰大白兔制备抗血清。VP3 蛋白的高效表达及兔源血清的制备为建立灵敏、快速的抗原抗体检测方法奠定了技术基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

番鸭细小病毒病料, 取自于 2012 年 5 月上海郊区一番鸭养殖场。MDPV J3D6 株 VP3 蛋白由哈尔滨兽医研究所水禽课题组赠送。MDPV 疫苗株由本实验室保存。清洁级青年雄性新西兰大白兔, 体重为 2.5 kg, 购自上海斯莱克实验动物中心, 在动物房饲养一周后免疫。

1.1.2 主要试剂

PrimeSTAR HS DNA 聚合酶等各种 PCR 反应试剂 DNA T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。PJET1.2/blunt 载体试剂盒以及限制性内切酶购自美国 Thermo scientific 公司。鼠源 His 单抗购

自联邦生物公司。HRP 标记山羊抗兔二抗购自 Solarbio 公司。Alaxe488 标记山羊抗兔二抗购自上海康稳生物科技有限公司。HRP 标记山羊抗鸭二抗购自于 KPL 公司。PET28a 原核表达载体和质粒 PXXGST-VP3 均由本实验室保存。其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成

根据 SAAS-SHNH 株全基因组 (GenBank Accession No. KC_171936.1) 的 *vp3* 全基因 (1 605 bp) 序列, 通过 primer5.0 软件设计两对特异性引物。引物 1 两端 (5'端和 3'端) 分别添加 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切位点, 引物列表 1 (小写部分是酶切位点)。引物由上海生工生物有限公司合成。

1.2.2 DNA 提取和 PCR 扩增

将死亡番鸭组织病料 (胰腺、脾脏), 用灭菌镊子剪碎, 研磨, 用 Axyprep DNA 提取试剂盒提取 DNA, 取适量用作 PCR 模板。

PCR 的反应体系: $5\times PrimeSTAR$ 缓冲液 10 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L each) 4 μ L, 上下游引物 (引物 1) 各 1 μ L, 模板 8 μ L, *PrimeSTAR HS* DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 1 μ L, 加 ddH₂O 补至 50 μ L。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 120 s (35 个循环); 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。产物进行凝胶电泳的鉴定后, DNA 胶回收试剂盒回收目的片段并连接至 PJET1.2/blunt

表 1 引物 DNA 序列

Table 1 Primers and their DNA sequences

Prime name	Primer sequence (5'-3')	Restriction enzyme
Forward 1	CTAgctagcATGGCAGAGGGAGGAAG	<i>Nhe</i> I
Reverse 1	CCGctegagTTACAGATTCTGAGTCAAAT	<i>Xho</i> I
Forward 2	ATGAACATGGGTGGTATGATT	
Reverse 2	ACTAGAATGCACTCCGGTCAT	

The small letters denote restriction sites.

载体,产物转化 Top 10;阳性克隆经 PCR、酶切和测序鉴定正确后命名为 PJETa-VP3 (引物 1 扩增)。

1.2.3 构建原核表达质粒及诱导表达

阳性质粒 PJETa-*vp3* 经 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切,目的片段回收后,与同样双酶切回收的 PET28a 载体 22 °C 连接 1 h,连接产物转化 Top 10,阳性克隆经 PCR、酶切和测序鉴定正确后命名为 PET28a-VP3。

1.2.4 重组质粒 PET28a-*vp3* 的诱导表达及纯化

阳性质粒 PET28a-*vp3* 转化 BL21,挑取单菌落接种至含有 50 µg/mL Kanamycin 的 LB 培养基中,37 °C 培养过夜。次日接种 (1 100) 于相同培养基,37 °C 培养至 OD_{500} 值为 0.5 时加入 1 mmol/L IPTG,将诱导表达后菌体进行超声破碎后,8 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀并用变性缓冲液溶解, Ni^{2+} 亲和层析纯化目标蛋白,对纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离后,KCl 染色液染色,准确切下含有目的蛋白的凝胶条带加入 PBS 后研磨,电泳后吸取上清,用 PEG 20000 浓缩蛋白,测定蛋白浓度,-20 °C 保存。

1.2.5 目的蛋白的鉴定

将制备的带有 His-tag 标签的 VP3 重组蛋白 (简称 VP3-his) 与 anti-His 单抗 (1:4 000) 以及 MDPV 疫苗免疫血清 (1:1 000) 进行 Western blotting 鉴定。

1.2.6 获得抗血清

将纯化后的 VP3-his 重组蛋白 1 mL (1 mg),加入等体积弗式完全佐剂乳化制备成油乳疫苗,经皮下多点免疫 2 只新西兰大白兔,第一次免疫后 14 d,将蛋白与等体积弗式不完全佐剂混合,制成油乳剂苗加强免疫,过 28 d 和 42 d 后进行第 3、4 次加强免疫。第 4 次免疫后

7 d 采血,收集血清。PBS 免疫组作为对照。

1.2.7 Western blotting 和 dot blotting 鉴定兔抗 VP3 蛋白多克隆抗体

将制备的兔抗 VP3 蛋白多克隆抗体与 J3D6 株 VP3 蛋白及本实验室保存的带有 GST 标签 (PXXGST 载体) 的 VP3 蛋白 (简称 VP3-gst) 进行 Western blotting 分析;将 VP3 蛋白多克隆抗体与 MDPV 疫苗株进行 dot blotting 分析。

1.2.8 细胞免疫荧光 (IFA) 抗体染色分析

将在番鸭胚尿囊液中传至 10 代后的 MDPV SAAS-SHNH 株感染原代鸭胚成纤维细胞 (Duck embryo fibroblasts, DEF),DEF 的制备方法参考阮二垒等的方法^[17]。DEF 传至 10 代,将在二氧化碳培养箱中培养 5 d 的 DEF 细胞取出,用 PBS 漂洗细胞 1 次,后用 3.7% 甲醛溶液在室温下将细胞固定 15 min, PBS 漂洗细胞 2 次;用 0.1% Triton-X100 室温下处理细胞 5 min 使细胞膜穿孔,用含 5% FCS 的封闭液室温作用 30 min。用稀释 200 倍的兔血清与细胞 37 °C 结合 45 min,血清用含 0.1% Tween-20 的 PBS 稀释;用含 0.1% Tween-20 的 PBS 漂洗细胞 3 次,用 Alexa488 标记二抗 37 °C 与细胞反应 45 min,第二抗体稀释 400 倍,稀释方法同一抗;用含 0.1% Tween-20 的 PBS 漂洗细胞 3 次。用稀释 1 000 倍的 DAPC 试剂与细胞结合 15 min,用 PBS 漂洗 3 次,后用 FluroSave Reagent 封片,荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 SAAS-SHNH 株 VP3 序列分析

将扩增的 SAAS-SHNH 株 *vp3* 全基因序列 (1 623 bp) 克隆到 PJET1.2/Blunt 载体,转化后保菌并测序,并将 *vp3* 基因与 GenBank 上登录

的 MDPV *vp3* 基因 (GenBank 登录号见图 1) 核苷酸序列比对后显示同源率为 85.1%–86.0% (结果未显示); 氨基酸序列比对同源率为 90.8%–91.9%, 其中与法国株 89384 (GenBank 登录号: Z68272.1) 的同源性最高, 结果见图 1。

2.2 PET28a-VP3 重组质粒的构建和鉴定

将保持的阳性克隆经双酶切鉴定正确后经 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切, 克隆到 PET28a 原核表

达载体, 阳性质粒经酶切鉴定并进行确证性序列测定, 表明目的基因克隆到载体的预期位置, 重组质粒 PET28a-VP3 构建成功。

2.3 VP3-His 的表达鉴定

PET28a-*vp3* 经 IPTG 诱导后, 在 63.1 kDa 处有一特异性条带, 推测为 VP3-his 表达, 结果见图 2。经过分析蛋白以包涵体的形式表达 (结果未显示)。

		Percent identity								
		1	2	3	4	5	6	7		
Divergence	1	■	99.3	98.3	98.1	98.1	98.7	91.4	1	AY510603.1
	2	0.8	■	98.3	97.8	97.8	98.3	91.2	2	JF926697.1
	3	1.7	1.7	■	97.2	97.2	97.8	90.8	3	JF926698.1
	4	1.9	2.3	2.9	■	100.0	99.4	91.4	4	NC_006147
	5	1.9	2.3	2.9	0.0	■	99.4	91.4	5	X75093.1
	6	1.3	1.7	2.3	0.6	0.6	■	91.9	6	Z68272.1
	7	9.2	9.4	9.8	9.2	9.2	8.5	■	7	KC171936.1
	1	2	3	4	5	6	7			

图 1 MDPV VP3 氨基酸序列的同源性分析

Fig. 1 The homology analysis of VP3 amino acid sequence of MDPV.

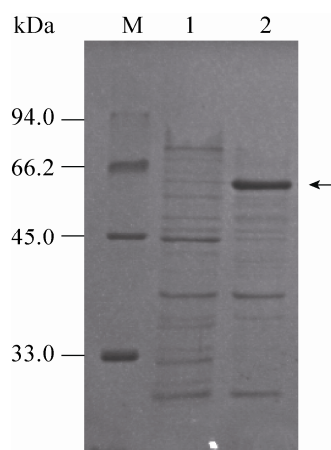


图 2 VP3-His 在 BL21 中的表达分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of protein expression by *E. coli* BL21 carrying vector PET28a-VP3. M: protein molecular weight standard; 1: expression by BL21 carrying the empty vector PET28a; 2: expression by BL21 carrying the vector PET28a-VP3. Arrow indicates the assumed VP3-His band.

2.4 目的蛋白的鉴定

Western blotting 分析发现诱导表达的 VP3 蛋白能够与 anti-His 单抗和番鸭细小病毒阳性血清发生反应, 结果如图 3 所示。

2.5 多克隆抗体分析

Dot blotting 结果显示, 研究制备的 VP3 蛋白兔多克隆抗体能与 MDPV 疫苗株发生免疫交叉反应 (图 4)。

研究发现制备的 VP3 蛋白兔多克隆抗体能与 MDPV J3D6 株 VP3 蛋白产生特异性杂交反应 (图 5)。

为进一步验证试验制备的兔多克隆抗体与 VP3 蛋白的特异结合能力, 将试验获得的兔源血清与本实验室保存的带 GST 标签 (PXXGST 载体)

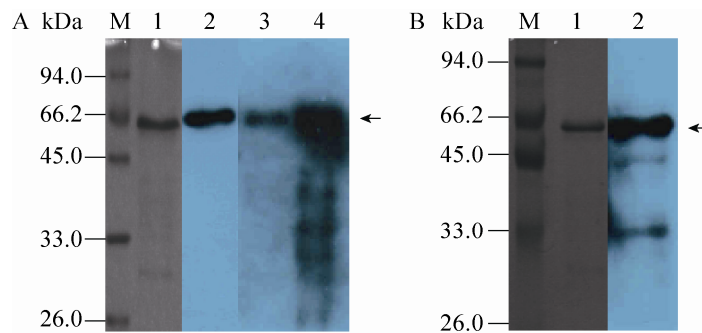


图3 VP3-His 的 Western blotting 鉴定

Fig. 3 Western blotting analysis of VP3-His protein using anti-His monoclonal antibody and serum from vaccinated Muscovy duck. (A) Detection of VP3-His by Western blotting with anti-His Mab. M: protein molecular weight standard; 1: SDS-PAGE analysis of proteins expressed by *E. coli* carrying vector PET28a-VP3; 2, 3: detection of purified VP3-His by Western blotting with anti-His Mab; 4: detection of unpurified VP3-His by Western blotting with anti-His Mab. (B) Detection of the purified VP3-His by Western blotting with anti-MDPV sera. M: molecular weight marker; 1: SDS-PAGE analysis of purified VP3-His; 2: detection of the purified VP3-His by Western blotting with anti-MDPV sera.

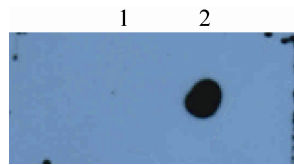


图4 兔多克隆抗体的 dot blotting 分析

Fig. 4 Dot blotting analysis of rabbit polyclonal antibody using traditional MDPV strain. 1: PBS control; 2: MDPV vaccine strain (Traditional MDPV strain).

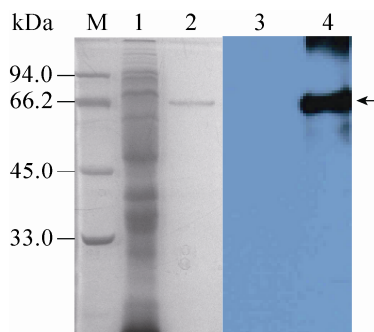


图5 兔多克隆抗体与 J3D6 株 VP3 蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting analysis of rabbit polyclonal antibody with VP3 protein of MDPV J3D6 strain. M: protein molecular weight standard; 1: SDS-PAGE of expressed proteins by PET32a; 2: protein expression by PET32a-VP3 (MDPV J3D6) after induction. 3: Western blotting of empty vector PET32a expression with the rabbit polyclonal antibody; 4: Western blotting of PET32a-VP3 with the rabbit polyclonal antibody. The arrow indicate the PET32a-VP3 band assumed.

的菌体蛋白 (VP3-GST) 作 Western blotting 分析, 结果表明兔血清多抗能够与 VP3-GST 特异性杂交反应 (图 6)。

2.6 免疫荧光试验

对原代 DEF 中增殖的病毒进行 IFA 分析后, 经过荧光显微镜可以观察到绿色荧光信号, 结果表明, MDPV VP3 蛋白存在于细胞质中, 也有一部分病毒蛋白位于细胞核, 结果如图 7 显示。

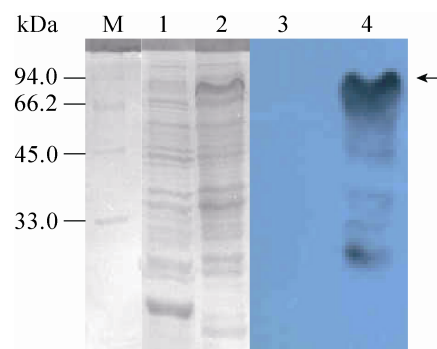


图6 VP3-GST 蛋白兔多克隆抗体的 Western blotting 鉴定

Fig. 6 Western blotting analysis of rabbit polyclonal antibody with VP3-GST. M: protein molecular weight standard; 1, 2: SDS-PAGE of PXXGST and PXXGST-VP3 expression; 3, 4: Western blotting of PXXGST and PXXGST-VP3 with rabbit polyclonal antibody.

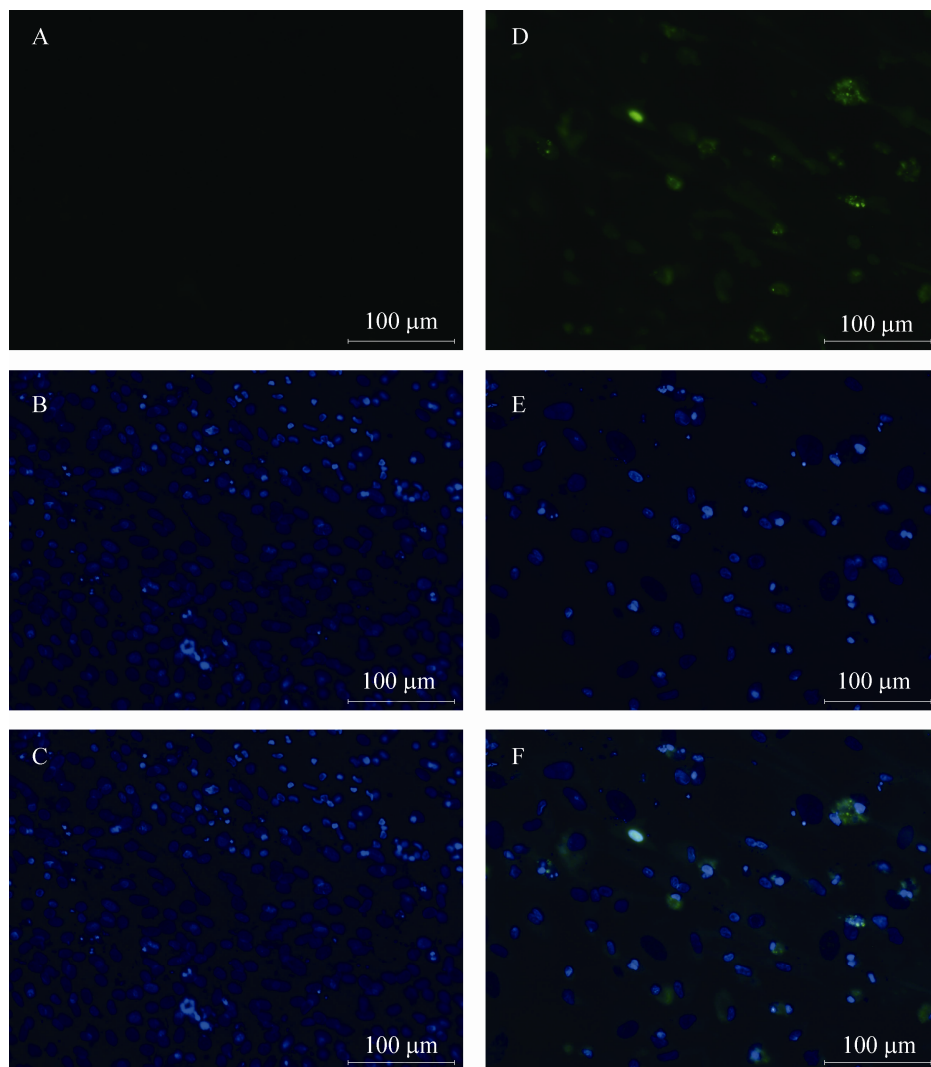


图 7 DEF 中 VP3 蛋白免疫荧光试验的检测

Fig. 7 Detection of VP3 protein by indirect immunofluorescence assay on DEF infected with SAAS-SHNH. (A) non-infection negative control of primary duck embryo fibroblasts (DEF), which was not infected with MDPV and IFA was made using rabbit polyclonal antibody as first antibody. (B) DEF in A was double stained with DAPI. (C) B was merged into A. (D) DEF was infected with MDPV and IFA was made using rabbit polyclonal antibody as first antibody. (E) DEF in D were double stained with DAPI. (F) E was merged into D. Positive signals of VP3 were mostly found in the cytoplasm.

3 讨论

番鸭细小病毒有 3 种结构蛋白, 研究表明 VP3 是主要的衣壳蛋白, 约占总蛋白的 80%^[18]。

细小病毒的结构蛋白 (VP1, VP2 和 VP3) 可刺激机体产生中和抗体, 通过体外表达细小病毒的结构基因, 制备重组抗原和相对应抗体, 可用于细小病毒的检测和该病的诊断^[19-20]。

本研究通过扩增 SAAS-SHNH 株 *vp3* 基因, 与 GenBank 登录的 6 株 MDPV *vp3* 基因的氨基酸序列比对, 发现它们的氨基酸序列同源性仅为 90.8%–91.9%, 与法国株 89384 毒株的同源性最高, 该毒株由 Le Gall RG 等^[15]于 1996 年分离得到; 6 株 MDPV *vp3* 基因氨基酸同源性达到 97.8%–99.4%。对 SAAS-SHNH 株 *vp3* 基因进行序列分析, *vp3* 全基因第 100–1 140 nt 位与鹅细小病毒 (GPV) GDaGPV 株^[21]基因发生重组, 占了 *vp3* 全基因的 70% (未发表)。

根据分离到的 MDPV SAAS-SHNH 株基因组序列, 用 PET28a 原核表达载体, 对 MDPV VP3 蛋白进行了原核表达, 并纯化制备得到抗血清, 血清效价较高为 $1:1 \times 10^5$ 。经 SDS-PAGE 与 Western blotting 分析, 表达的重组 VP3 蛋白能够与番鸭阳性血清结合良好, 说明表达的 VP3 蛋白可用于 MDPV 的血清学检测; 经 Western blotting 分析发现制备的兔血清不仅能与研究中新分离 SAAS-SHNH 株 VP3 蛋白 (带 *gst* 标签) 结合, 而且能与 MDPV J3D6 株 VP3 蛋白以及病毒疫苗株特异性结合, 提示制备的免疫血清不仅可以有效地检测到 SAAS-SHNH 株 VP3 蛋白, 而且可以检测传统毒株的 VP3 蛋白。黎明等^[22]预测了 MDPV 衣壳蛋白线性表位的优势区域, 其中 VP3 蛋白的优势线性表位为 91–97, 本实验室获得的 SAAS-SHNH 株 VP3 蛋白的优势表位未发生改变, 这可能是免疫血清与 MDPV 疫苗株具有交叉反应的原因。

MDPV 进行初代分离只能在鹅胚或番鸭胚上复制, 而且其胚体适应毒能在鹅胚、番鸭胚等制成的纤维细胞上增殖^[17]。因此, 我们将经番鸭胚传至 10 代后的病毒接种到原代 DEF, 与正常原代 DEF 细胞相比, 病毒感染后的细胞形

态变差, 细胞变长、变细。对于 MDPV 在细胞中的分布, 不同研究者的结果不一致^[23-25]。Yin 等^[23]研究过水禽细小病毒 VP3 蛋白在细胞中的分布, 病毒 VP3 蛋白主要位于细胞核中, 在核仁中不存在病毒 VP3, 仅有少量的病毒蛋白位于细胞质中。Marin Alexandrov 等^[24]研究发现, 病毒颗粒不仅存在于细胞核中, 在一些阳性细胞的细胞质中也能够发现大量颗粒状的病毒。本研究通过 IFA 实验也发现 VP3 病毒蛋白不仅位于细胞核, 也存在于细胞质中, 其分布现象和机理有待进一步试验探索。

在本研究中, 构建 MDPV VP3 原核表达载体, 对 VP3 蛋白进行原核表达, 表达的蛋白与番鸭阳性血清能够特异性杂交; 获得的抗血清, 可用于 MDPV 疫苗株和细胞病毒增殖的检测。研究为 MDPV 流行毒株的抗原抗体检测和进一步的深入研究积累了技术基础。

REFERENCES

- [1] Ruan EL, Chen FY, Chen RA, et al. Advances in study of Muscovy duckling parvovirus. Chin Anim Health Inspect, 2009, 26(5): 68–70 (in Chinese).
阮二垒, 陈芳艳, 陈瑞爱, 等. 雏番鸭细小病毒病的研究进展. 中国动物检疫, 2009, 26(5): 68–70.
- [2] Zi GM, Du WX, Chen JH. Advances in study of Muscovy duckling parvovirus. Guangdong J Anim Vet Sci, 1999, 24(2): 3–8 (in Chinese).
姿高明, 杜伟贤, 陈建红. 雏番鸭细小病毒病研究进展. 广东畜牧兽医科技, 1999, 24(2): 3–8.
- [3] Glavits R, Zolnai A, Szabo E, et al. Comparative pathological studies on domestic geese (*Anser anser domestica*) and Muscovy ducks (*Cairina moschata*) experimentally infected with parvovirus strains of goose and Muscovy duck origin. Acta Vet Hung, 2005, 53(1): 73–89.

- [4] Zhang Y, Gen HW, Guo DC, et al. Sequence analysis of the full length genome of waterfowl parvovirus. *Chin J Pre Vet Med*, 2008, 30(6): 415–419 (in Chinese).
张云, 耿宏伟, 郭东春, 等. 鹅和番鸭细小病毒全基因克隆与序列分析. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(6): 415–419.
- [5] Li ST, Yu XL, Chen BT, et al. Diagnosis of a new Muscovy viral disease. *Chin J Anim Poultry infect dis*, 1991, 2: 26–27 (in Chinese).
林世棠, 郁晓岚, 陈炳钊, 等. 一种新的雏番鸭病毒性传染病的诊断. *中国畜禽传染病*, 1991, 2: 26–27.
- [6] Le Gall-Reculé G, Jestin V. Biochemical and genomic characterization of Muscovy duck parvovirus. *Arch Virol*, 1994, 139: 121–131.
- [7] Zádori Z, Stefancsik R, Rauch T, et al. Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2. *Virology*, 1995, 212(2): 562–573.
- [8] Chen YX, Lin TL, Hu QL, et al. Isolation and identification of a muscovy duckling parvovirus. *Chin J Virol*, 1993, 3(9): 228–235 (in Chinese).
程由铨, 林天龙, 胡奇林, 等. 雏番鸭细小病毒病的病毒分离和鉴定. *病毒学报*, 1993, 3(9): 228–235.
- [9] Dong JW, Li LL, Sun MH, et al. Advances in study of Muscovy Duckling Parvovirus. *Poultry Husbandry Disease Control*, 2012, 10(2): 2–6 (in Chinese).
董嘉文, 李林林, 孙敏华. 雏番鸭细小病毒病研究进展. *养禽与禽病防治*, 2012, 10(2): 2–6.
- [10] Poonia B, Dunn PA, Lu H, et al. Isolation and molecular characterization of a new Muscovy duck parvovirus from Muscovy ducks in the USA. *Avian Pathol*, 2006, 35(6): 435–441.
- [11] Song YF, Wu FX, Song YH, et al. Molecular epidemiology study of Muscovy duck parvovirus strains from Guangdong province between 2008 and 2009. *Chin Anim Health Inspect*, 2010, 27(1): 39–40 (in Chinese).
宋永峰, 吴发兴, 宋延华, 等. 2008年-2009年广东番鸭细小病毒分子流行病学研究. *中国动物检疫*, 2010, 27(1): 39–40.
- [12] Brown KE, Green SW, Young NS. Goose parvovirus—An autonomous member of the dependovirus genus? *Virology*, 1995, 210(2): 283–291.
- [13] Ji F, Zhang MJ, Yang ZQ, et al. Cloning and sequencing of the VP1 genes from muscovy duck parvovirus and goose parvovirus of Guangdong strain. *Chin J Pre Vet Med*, 2004, 26(4): 245–246 (in Chinese).
季芳, 张毓金, 杨增岐, 等. 番鸭细小病毒和鹅细小病毒广东株 VP1 基因的克隆与序列分析. *中国预防兽医学报*, 2004, 26(4): 245–246.
- [14] Yun Z, Yong FL, Ming L, et al. Development and evaluation of a VP3-ELISA for the detection of goose and Muscovy duck parvovirus antibodies. *J Vir Met*, 2010, 163(2): 405–409.
- [15] Le Gall RG, Jestin V, Chagnaud P, et al. Expression of muscovy duck parvovirus capsid proteins (VP2 and VP3) in a baculovirus expression system and demonstration of immunity induced by the recombinant proteins. *J Gen Virol*, 1996, 77(9): 2159–2163.
- [16] Wang CY, Shieh HK, Shien JH, et al. Expression of capsid proteins and non- structural proteins of waterfowl parvoviruses in *Escherichia coli* and their use in serological assays. *Avian Pathol*, 2005, 34(5): 76–82.
- [17] Ruan EL, Chen SM, Zhu XG, et al. Multiplication of Muscovy duck parvovirus in duck embryo fibroblasts. *Shanghai J Anim Husbandry Vet Med*, 2011, 2: 45–46 (in Chinese).
阮二垒, 陈申秒, 朱秀高, 等. 番鸭细小病毒在番鸭胚成纤维细胞上的培养. *上海畜牧兽医通讯*, 2011, 2: 45–46.
- [18] Wang CY, Shieh HK, Shien JH, et al. Expression of capsid proteins and non-structural proteins of waterfowl parvoviruses in *Escherichia coli* and their use in serological assays. *Avian Pathol*, 2005, 34(5): 376–382.

- [19] Hou QL, Wang J, Liu SW, et al. Expression of the *vp2* gene fragment of goose parvovirus in Prokaryotic system and preparation of its antiserum. *Vir Sin*, 2005, 2(4): 383–387 (in Chinese).
侯秋莲, 王静, 刘胜旺, 等. 鹅细小病毒 VP2 基因片段在原核系统中的表达及多克隆抗体的制备. *中国病毒学*, 2005, 2(4): 383–387.
- [20] Chun CY, Pan MJ, Cheng JT. Genetic variation of nucleocapsid genes of waterfowl parvovirus. *J Vet Med Sci*, 2001, 63(11): 1165–1170.
- [21] Wan CH, Zhu HX, Huang Y, et al. Genomic characterizations of a parvovirus isolation from goose. *Chin J Anim Infect Dis*, 2011, 19(4): 19–24 (in Chinese).
万春和, 朱海侠, 黄瑜, 等. 一株鹅细小病毒全基因特征分析. *中国动物传染病学报*, 2011, 19(4): 19–24.
- [22] Li M, Yu TF, Xu S, et al. Immunologic cross-reactivity between Muscovy duck parvovirus and goose parvovirus on the basis of bioinformatics prediction. *Guangdong Agric Sci*, 2011, 24(2): 120–121 (in Chinese).
黎明, 于天飞, 徐爽, 等. 基于生物信息学预测的番鸭细小病毒和鹅细小病毒免疫交叉反应研究. *广东农业科学*, 2011, 24(2): 120–121.
- [23] Yin XC, Zhang SM, Gao YL, et al. Characterization of monoclonal antibodies against waterfowl parvoviruses VP3 protein. *Virology*, 2012, 9: 288.
- [24] Marin A, Radostina A, Ivailo AD, et al. Fluorescent and electron-microscopy immunoassays employing polyclonal and monoclonal antibodies for detection of goose parvovirus infection. *J Virol Methods*, 1999, 79(1): 21–32.
- [25] Ju HY, Wei N, Wang CY, et al. Goose parvovirus structural proteins expressed by recombinant baculoviruses self-assemble into virus-like particles with strong immunogenicity in goose. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 409(1): 131–136.

(本文责编 郝丽芳)